Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen zum Toleranzphänomen von exogenem und endogenem Viruspyrogen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Ortrun Döhner
aus Frankfurt/Main

Marburg 1973

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen zum Toleranzphänomen von exogenem und endogenem Viruspyrogen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Ortrun Döhner

aus Frankfurt/Main

Marburg 1973

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 23. Januar 1973

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof.Dr.med. H. Oepen
Referent: Prof.Dr.med. R. Siegert
Correferent: Prof.Dr.med. W. Mannheim

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	7
	1. Virusarten	7
	2. Viruszüchtung	7
	3. Versuchstiere	8
	4. Pufferlösungen	8
	5. Pyrogenfreiheit von Geräten und Lösungen	8
	6. Haemagglutinationstest	8
	7. Pyrogenprüfung	9
	8. Gewinnung von Leukozytenpyrogen	9
	9. Gewinnung von endogenem Pyrogen	10
	10. Quantitative Bestimmung von endogenem und exogenem Pyrogen	10
	11. Toleranzprüfung	10
III.	Ergebnisse	11
	1. Verweildauer von Newcastle disease Virus (NDV) im Blut nach intravenöser Injektion	11
	2. Unterschiede im Verhalten von Leukozytenpyrogen und endogenem Pyrogen	13
	3. Dosiswirkungskurve des endogenen Pyrogens	16
	4. Fiebertoleranz gegenüber Influenzavirus APR_8 nach Vorinjektion von Leukozytenpyrogen oder endogenem Pyrogen	17
	5. Fiebertoleranz gegenüber Newcastle disease Virus nach Vorinjektion von Leukozytenpyrogen oder endogenem Pyrogen	19
	6. Fiebertoleranz bei Reinjektion von endogenem Pyrogen	20
	7. Fiebertoleranz gegenüber endogenem Pyrogen nach Injektion von Influenzavirus APR_8	24
	8. Fiebertoleranz gegenüber endogenem Pyrogen nach NDV-Injektion	27
	9. Toleranzentwicklung bei mehrmaligen NDV-Gaben	29
IV.	Diskussion	31
V.	Zusammenfassung	35
VI.	Literaturverzeichnis	37

I. EINLEITUNG

Die pyrogene Eigenschaft des Influenzavirus wurde erstmals 1949 nach intravenöser Verabreichung beim Kaninchen beobachtet (BENNETT et al., 1949a). Die Fieberantwort erfolgt nach einer Latenz von 60 - 90 Minuten. Sie verläuft meist biphasisch und dauert 6 - 8 Stunden.

Die Pyrogenität ist an das Virion gebunden und hängt nicht - was durchaus denkbar wäre - mit toxischen Stoffwechselprodukten der Wirtszellen zusammen (SIEGERT und BRAUNE, 1955). Die Kinetik der thermischen Inaktivierung zeigt, daß die Infektiosität und Toxizität des Influenzavirus bei schonender Erhitzung verlorengehen, ohne seine pyrogene Eigenschaft zu beeinträchtigen. Dagegen stimmt die Thermoresistenz des Pyrogens mit dem Haemagglutinin überein. Sie spricht für eine stoffliche Identität beider Virusqualitäten (WAGNER, BENNETT et al., 1949). Demgegenüber läßt sich aber das Haemagglutinin vom pyretischen Prinzip durch verschiedene chemisch-physikalische Methoden dissoziieren, z.B. durch UV-Bestrahlung oder Formaldehydeinwirkung (SIEGERT und BRAUNE, 1964b), so daß die Pyrogenität eine selbständige Virusqualität darstellen dürfte. Bei der Ätherspaltung des Myxovirus geht die Pyrogenität verloren (SIEGERT und BRAUNE, 1964b). Die beiden isolierten Spaltprodukte Haemagglutinin und RNP-Antigen sind apyrogen (SIEGERT und BRAUNE, 1964b; KANOH und KAWASAKI, 1966). Ein geringer Anteil des pyrogenen Prinzips läßt sich vom Virion enzymatisch mit Trypsin oder Phospholipase A abspalten (SIEGERT et al., 1967c).

Die pyrogene Eigenschaft der Myxoviren scheint ein Lipoproteid zu sein. Dafür sprechen ihre Unlöslichkeit in Wasser, ihre geringe Thermoresistenz, ihre Inaktivierbarkeit durch Lipid-Lösungsmittel und ihre geringe Antigenität

(SIEGERT et al., 1967a). Demgegenüber sind die bakteriellen Pyrogene wasserlösliche, hitzestabile Lipopolysaccharide, die bereits nach einer kürzeren Latenzphase von 30 - 60 Minuten zur Wirkung gelangen.

Die Untersuchungen des Fiebermechanismus von Endotoxin haben gezeigt, daß es nicht direkt, sondern erst durch Induktion eines sekundären Pyrogens zur Wirkung gelangt (ATKINS and WOOD, 1955a/b; WOOD, 1955). Dieses endogene Pyrogen (EP) läßt sich leicht durch Blutübertragung von fiebernden Spendertieren auf normale Kaninchen nachweisen. Es führt unmittelbar ohne Latenz zur Fieberreaktion. Das endogene Pyrogen wurde nachgewiesen nach Injektion von Typhus-Vakzine (ATKINS and WOOD, 1955a/b), Pneumokokken (BENNETT, 1956; KING and WOOD, 1958), Streptokokken (ATKINS, 1956; KING and WOOD, 1958), Staphylokokken (ATKINS and FREEDMAN, 1963) und auch bei experimenteller Tuberkulin-Überempfindlichkeit (HALL and ATKINS, 1959). Das endogene Pyrogen wird wahrscheinlich an Chemorezeptoren des Temperatur-Regulationszentrums im Hypothalamus gebunden (ALLEN, 1965; COOPER et al., 1966), wodurch sich der Anstieg der Körpertemperatur erklärt. Auch bei der Infektion mit Influenzavirus erscheint endogenes Pyrogen im Serum der Kaninchen (SIEGERT, 1957; ATKINS and HUANG, 1958a).

Der sekundäre Fieberstoff ist zellulären Ursprungs. Dafür spricht die Leukozytopenie nach Pyrogeninjektion (HARRIS and HENLE, 1948; WAGNER et al., 1949), ferner die Tatsache, daß die Fieberantwort bei einer experimentellen Leukopenie durch N-Lost-Vorbehandlung ausbleibt. Schließlich spricht dafür, daß endogenes Pyrogen in vitro entsteht, wenn Kaninchen-Exsudatgranulozyten sowohl mit Endotoxin (BENNETT and BEESON, 1953) als auch mit Para- bzw. Myxovirus (ATKINS et al., 1964; SIEGERT et al., 1967a) inkubiert werden. Von den Zellen des Kaninchen-Blutes, die

mit Hilfe der Rabinowitz-Säule fraktioniert worden waren, scheinen nur die Granulozyten, nicht aber die Lympho-, Thrombo- und Erythrozyten endogenes Pyrogen zu bilden (TABORSKY und KOHLHAGE, 1971).

Die Produktion des virusinduzierten, sekundären Fieberstoffs dürfte auf einer de-novo-Synthese beruhen, da sie in vivo und in vitro quantitativ durch Actinomycin C (KOSEL und KOHLHAGE, 1970) sowie durch Cycloheximid (TABORSKY und KOHLHAGE, 1970) gehemmt wird. Virusinfizierte Exsudatleukozyten sollen zwei- bis dreimal größere Pyrogenmengen produzieren als nicht infizierte Zellen (KANOH and KAWASAKI, 1966), die bereits bei Alterung thermisches Pyrogen freisetzen ("Leukozytenpyrogen"). Eine Virusvermehrung ist keine Voraussetzung für die Bildung des endogenen Pyrogens (SIEGERT, 1968), sondern es genügt zur Induktion die Penetration des Virion.

Endogenes Pyrogen wurde nach der intravenösen Injektion von Myxovirus nicht nur im Blut, sondern auch in den Organen der Versuchstiere gefunden (SHU und TAN, 1970). Gleichzeitig erscheinen neben endogenem Pyrogen auch Lysozym (SHULMAN and PETERSDORF, 1963) und Interferon (SIEGERT et al., 1967b) in der Blutbahn. Inkubation, Anstieg, Maximum und Abfall des Interferontiters korrelieren in auffälliger Weise mit dem endogenen Pyrogen sowohl im Serum als auch in verschiedenen Organen (SIEGERT et al., 1967b; SHU und TAN, 1970). Beide Wirkstoffe sind hinsichtlich ihrer Eigenschaften eng verwandt (SIEGERT, 1971). Die von HO (1960) vermutete stoffliche Identität trifft jedoch nicht zu. Endogenes Pyrogen und Interferon zeigen nämlich ein verschiedenes physikochemisches Verhalten (KOHLHAGE et al., 1968).

Bei endogenem Pyrogen handelt es sich um ein Proteid (HADLEY et al., 1966; RAFTER et al., 1966; SIEGERT et al.,

1967a). Nach Säulentrennung über Biogel und Sephadex G 100 ergab sich für das virusinduzierte endogene Pyrogen ein Molekulargewicht von ca. 40.000 (SIEGERT et al., 1967a). Für das endotoxininduzierte endogene Pyrogen wurden dagegen Molekulargewichte von 10.000 bis 20.000 im Sucrosegradienten (WOOD et al., 1966) sowie von 50.000 bis 70.000 durch elektronenmikroskopische Messungen ermittelt (FRITZ et al., 1964; GANDER et al., 1962). Es liegen Anhaltspunkte dafür vor, daß verschiedene Molekülspezies je nach Art des Induktors existieren (RIECK und KOHLHAGE, 1970).

Die Aktivität von Virus- und Endotoxin-induziertem endogenem Serum-Pyrogen ist nach Biogel-Passage beträchtlich gesteigert, was zu der Vermutung Anlaß gibt, daß durch die Säulenchromatographie ein unspezifischer Inhibitor abgespalten wird (KOHLHAGE und RIECK, 1967).

Wird die intravenöse Injektion von Myxo- oder Paramyxoviren nach 24 Stunden wiederholt, so besteht je nach Viruskombination eine komplette oder inkomplette Toleranz (ATKINS and HUANG, 1958a; SIEGERT et al., 1962). Handelt es sich bei der zweiten Injektion um Influenzavirus, so weist das Versuchstier eine vollständige Resistenz auf, wobei weder in der Blutbahn (SIEGERT, 1957; ATKINS and HUANG, 1958a; SIEGERT et al., 1962), noch in den Organen (SHU und TAN, 1970) endogenes Pyrogen zu finden ist. Werden jedoch Newcastle disease Virus oder klassisches Geflügelpestvirus 24 Stunden nach der ersten Injektion verabreicht, so liegt nur eine partielle Toleranz vor, der eine verminderte Produktion von endogenem Pyrogen im Blut und in den Organen entspricht (SHU und TAN, 1970). Die Stärke der Toleranz hängt von der Art und Dosis des erstinjizierten Virus ab (FRENCH, 1952; WAGNER, 1953; ATKINS and HUANG, 1958). Mit Hilfe des Toleranzphänomens kann man die Myxo- und Paramyxoviren in 2 Gruppen einteilen (SIEGERT, 1957; SIEGERT et al., 1962). Zwischen Bakterien- und Viruspyrogenen besteht keine Kreuztoleranz (BENNETT et al., 1949b).

Der Mechanismus des Toleransphänomens ist unklar. Antikörper kommen dafür nicht in Betracht, weil die Toleranz bereits 24 Stunden nach der Erstinjektion eines Pyrogens besteht. Die Pyrogenempfindlichkeit der Kaninchen kehrt vielmehr im Verlauf von 12 Tagen wieder zur ursprünglichen Reaktionslage zurück, in einer Zeit also, in der die Antikörper auftreten (SIEGERT et al., 1962). Es trifft auch nicht zu, daß durch die Erstinjektion die Zellrezeptoren zerstört werden (FRENCH, 1952). Durch Vorbehandlung von Kaninchen mit gereinigtem "receptor destroying enzyme" (RDE) läßt sich keine Pyrogentoleranz erzielen (WAGNER, 1953).

Das Toleranzphänomen dürfte aufgrund der bisherigen Untersuchungen auf einem Mechanismus beruhen, der entweder die Bildung oder die Ausschleusung von endogenem Pyrogen beeinträchtigt (ATKINS, 1960), oder durch einen Hemmstoff zustandekommt, der den sekundären Fieberstoff blockiert. Folgende Beobachtungen wurden beschrieben:

1. Bei Endotoxintoleranz ist die Entfernung des Endotoxins aus der Blutbahn durch erhöhte Aktivität des RES und einige humorale Faktoren beschleunigt (BEESON, 1947b, FARR et al., 1954; ATKINS and WOOD, 1955a). Durch RES-Blockade wird die Toleranz aufgehoben (BEESON, 1947b; ATKINS and WOOD, 1955b; PETERSDORF et al., 1957).

2. Bei Viruspyrogentoleranz verschwindet das Virus aus der Blutbahn nicht beschleunigt (ATKINS and HUANG, 1958c). Man kann die Toleranz nicht durch RES-Blockade mit Thoriumdioxyd durchbrechen (BENNETT et al., 1949b). Da sich dieser Zustand mit Serum oder Plasma auf Normaltiere übertragen läßt (BENNETT et al., 1949b), wird im Serum ein "Toleranzfaktor" angenommen, der das exogene Pyrogen blockiert (SIEGERT, 1957; SIEGERT et al., 1967b).

Ähnlich wie durch Viren soll auch eine Toleranz durch große Mengen endogenen Pyrogens induziert werden (ATKINS and HUANG, 1958c). Virusinduziertes endogenes Pyrogen kann in normalen Kaninchen biphasisches Fieber hervorrufen, obgleich es kein nachweisbares Virus enthalt. Bei Tieren, die gegenüber Virus oder endogenem Pyrogen Toleranz entwickelt hatten, wurde nach der Injektion von endogenem Pyrogen nur monophasisches Fieber gefunden (ATKINS and HUANG, 1958c). Man schloß daraus, daß der erste Gipfel durch die direkte Wirkung des endogenen Pyrogens auf das thermoregulatorische Zentrum entstent, während der zweite Gipfel durch ein sekundär freigesetztes endogenes Pyrogen zustande kommen soll (ATKINS and HUANG, 1958c).

Die Aufgabe dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zur näheren biologischen Charakterisierung des Toleranzphänomens bei Viruspyrogen und endogenem Pyrogen zu leisten.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Virusarten:

Das Newcastle disease virus (NDV), Stamm Italien, wurde freundlicherweise von den Behringwerken, Marburg/Lahn, zur Verfügung gestellt.

Das Influenzavirus A (PR_8) stammte vom Hygiene-Institut, Marburg/Lahn. Die Viren waren seit Jahren in bestimmten Abständen in Bruteiern passagiert worden. Die Passagezahl ist unbekannt.

2. Viruszüchtung:

Die Myxo- bzw. Paramyxoviren wurden in Konzentrationen von ca. 10^4 ID_{50} in trisgepufferter NaCl-Lösung (pH 7,5) in die Allantoishöhlen von 10 Tage alten Hühnerembryonen injiziert. Die Züchtung von NDV erfolgte bei 37,8°C, von Influenzavirus A PR_8 bei 35°C. Die Allantoisflüssigkeiten sind nach 40 - 44 Stunden geerntet und im Kühlschrank gelagert worden. Nach aerober und anaerober Sterilitätskontrolle wurden die Eiflüssigkeiten des gleichen Ansatzes vereinigt und 10 Min. bei 3.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 20.000 UpM (Spinco, Rotor 21) ultrazentrifugiert, das Sediment in pyrogenfreier, trisgepufferter NaCl-Lösung im Verhältnis 1:20 aufgeschwemmt, 1 Min. mit Ultraschall behandelt, nochmals bei 3.000 UpM für 30 Min. zentrifugiert und auf seinen Haemagglutiningehalt geprüft. Die Viruschargen enthielten schließlich Titer von durchschnittlich 1:16.000/ml.

Die Aufbewahrung erfolgte bei - 70°C. Die zu injizieren-

den Viruskonzentrationen wurden mit pyrogenfreier trisgepufferter NaCl-Lösung jeweils eingestellt.

3. Versuchstiere:

Die Pyrogen- und Toleranzprüfungen erfolgten an Kaninchen beiderlei Geschlechts und verschiedener Herkunft im Gewicht von 2 - 3 kg.

4. Pufferlösungen:

a) Phosphatgepufferte NaCl-Lösung: 0,01 m Na_2PO_4 in 0,85%iger NaCl-Lösung mit 0,01 m KH_2PO_4 in 0,85%iger NaCl-Lösung (pH 7,2).

b) Trisgepufferte NaCl-Lösung: 0,2 m Tris in aqua bidest. mit 0,1 m HCl (pH 7,5). Zum Mischen der Lösungen wurde ein Magnetrührer, und zur pH-Einstellung ein elektrisches pH-Meter verwendet.

5. Pyrogenfreiheit von Geräten und Lösungen:

Die Spritzen und Glasgeräte waren zur Erzielung von Sterilität 2 Stunden bei 180°C im Heißluftsterilisator erhitzt worden. Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und 1/2 Stunde bei 1 Atü autoklaviert. Ihre Pyrogenfreiheit wurde jeweils durch Injektion von 20 ml in die Randohrvene eines Kaninchens geprüft.

6. Haemagglutinationstest:

Wir benutzten die Methode von TAKATSY, modifiziert nach SEVER (1962). Aus der Flügelvene vom Huhn wurden 2 - 5 ml Blut entnommen und mit 1/5 des Volumens 3,8%igem Natrium-

citrat zur Gerinnungshemmung versetzt. Nach dreimaligem Waschen in phosphatgepufferter NaCl-Lösung (pH 7,2) wurden 2%ige Erythrozytensuspensionen hergestellt. Im Kühlschrank waren sie 2 - 4 Tage haltbar.

In der Mikrotiterplatte aus Plexiglas (Microbiological Associate, USA) wurden Virusverdünnungsreihen in 0,025 ml phosphatgepufferter NaCl-Lösung mit dem Faktor 2 angelegt und zu jeder Verdünnungsstufe 0,025 ml Hühnererythrozytensuspension hinzugefügt. Die Ablesung des Ergebnisses erfolgte nach 30 Minuten bei 4°C.

7. Pyrogenprüfung:

Die Proben wurden Kaninchen (2 - 3 kg) in die Randohrvene gespritzt. Wegen der individuellen Temperaturschwankungen bezogen sich die Untersuchungen jeweils auf Kollektive von 4 - 10 Tieren. Die Rektaltemperaturen sind mittels elektrischer Meßgeräte von Hartmann & Braun, Frankfurt/Main, mit je 6 Meßstellen registriert worden. Während der Temperaturmessung waren die Kaninchen in engen Drahtkäfigen fixiert, so daß keine Wärmestauung eintreten konnte. Die Fühler wurden 6 cm tief in den Enddarm eingeführt und am Schwanz fixiert. Es kamen nur solche Kaninchen zum Einsatz, bei denen nach 1 - 2 Stunden eine Temperaturkonstanz zwischen 38 bis 39°C eingetreten war. Kaninchen mit einer Temperaturschwankung von über 0,3°C wurden nicht verwendet. Die Raumtemperatur betrug 22 - 24°C.

8. Gewinnung von Leukozytenpyrogen (LP):

Hierzu wurden 200 - 300 ml einer 0,3%igen Stärkelösung Kaninchen intraperitoneal injiziert. Nach 16 - 20 Stunden wurde das Exsudat aus der Peritonealhöhle steril entnommen und bei 2.000 UpM für 10 Minuten zentrifugiert.

Das Sediment wurde in trisgepufferter NaCl-Lösung so aufgeschwemmt, daß die Leukozytenzahl ca. 2 x 10^6/ml betrug. Diese Exsudatleukozyten wurden mit 40 HE NDV/ml oder ohne NDV 6 Stunden bebrütet und dann bei 20.000 UpM 2 Stunden ultrazentrifugiert. Der Überstand enthielt das Leukozytenpyrogen. Der ohne Virus freigesetzte Fieberstoff wurde "Thermoleukozytenpyrogen" genannt, bei Bebrütung mit NDV entstand das sog. "NDV-Leukozytenpyrogen".

9. Gewinnung von endogenem Pyrogen (EP):

Die erforderliche Virusinjektion erfolgte in die Randohrvene. Es wurden jeweils 2.500 HE NDV/kg bzw. 3.000 HE PR_8/kg Körpergewicht injiziert. Nach 4 Stunden wurden die Kaninchen durch Herzpunktion steril entblutet, und die nach Zentrifugation (10 Minuten bei 6.000 UpM) gewonnenen Seren bei - 70°C aufbewahrt. Vor Gebrauch erfolgten Sterilitätsprüfungen mit Blutagarplatten, in Traubenzuckerbouillon- und Thioglykollatröhrchen.

10. Quantitative Bestimmung von exogenem und endogenem Pyrogen

Sie erfolgte durch Ermittlung des "Fieberindex". Hierunter wird die Fläche verstanden, die nach Pyrogeninjektion von der Fieberkurve und Basislinie umschrieben ist. FJ - 3 bedeutet der Fieberindex über 3 Stunden nach Injektion von exogenem oder endogenem Pyrogen bei bestimmter Papiervorschubgeschwindigkeit und Schreiberempfindlichkeit.

11. Toleranzprüfung

Sie erfolgte durch Injektion von Virus, LP oder EP in die Randohrvene entsprechend der Versuchsanordnung.

III. ERGEBNISSE

1. Verweildauer von Newcastle disease Virus (NDV) im Blut nach intravenöser Injektion

Frühere Untersucher hatten gezeigt, daß intravenös injiziertes NDV schnell aus dem strömenden Kaninchenblut eliminiert wird (ATKINS and HUANG, 1958a). Jedes Kaninchen erhielt bei diesen Versuchen 1024 HE, was einer LD_{50} von ca. 10^{10} entsprach. Trotz dieser hohen Dosis war der Virustiter nach 30 Minuten auf weniger als 10^{1} abgesunken und nach 4 Stunden überhaupt kein Virus mehr nachweisbar. Bei pyrogentoleranten Tieren verschwand das NDV nicht schneller als bei Normaltieren. Hierin liegt ein grundsätzlicher Unterschied zum Verhalten von endotoxintoleranten Kaninchen, bei denen das pyrogene Endotoxin rascher aus der Blutbahn durch das RES eliminiert wird als bei unvorbehandelten Kontrollen (BEESON, 1947; FARR et al., 1954; GREISMAN et al., 1965, 1966).

Zur Gewinnung von virusinduziertem endogenen Pyrogen (EP) wurden 2500 HE/kg injiziert, was einer Infektionsdosis von ca. $6{,}25 \times 10^{10}$ LD_{50} entsprach. In bestimmten Abständen nach der Injektion wurden Blutproben entnommen und auf ihren Virusgehalt durch Beimpfung von Hühnerembryonen ausgewertet. Zum Vergleich erhielten vorher tolerant gemachte Kaninchen die entsprechende Virusdosis, um zu prüfen, ob auch bei virusinduzierter Pyrogentoleranz der Induktor - in Übereinstimmung mit bakteriellem Endotoxin - schneller als von Normaltieren eliminiert wird.

Wie die Abbildung 1 zeigt, verschwindet das injizierte NDV bei normalen und toleranten Kaninchen synchron. In-

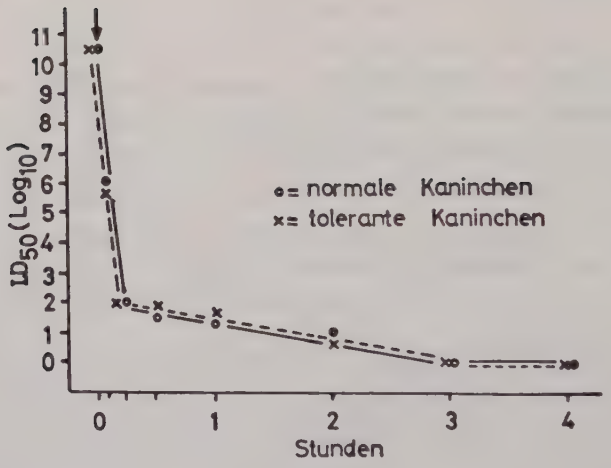

Abbildung 1: Kinetik der NDV-Eliminierung bei normalen und toleranten Kaninchen. Abszisse: Zeit nach der NDV-Injektion. Ordinate: NDV-Titer (LD_{50}) im Blut. ↓Zeitpunkt der Injektion. Mittelwertkurven von je 4 Kaninchen.

nerhalb der ersten 15 Minuten sank der Virustiter auf 10^2 , nach 3 Stunden war kein freies Virus mehr nachweisbar. Dieser Versuch bestätigt die Beobachtung von ATKINS und HUANG (1958a), wonach ein grundsätzlicher Unterschied im Toleranzphänomen besteht, je nachdem, ob es durch Viruspyrogen oder Endotoxin induziert wird. Da das Viruspyrogen nach 3 Stunden aus dem Blut verschwunden ist, kann es bei Entnahme des EP nach 4 Stunden nicht mehr als Fieberinduktor wirksam sein.

Bei diesen Ergebnissen ist allerdings zu bedenken, daß bei NDV das Toleranzphänomen nicht so stark ausgeprägt ist wie bei Influenzavirus, so daß durch entsprechende Versuche mit APR_8 noch klarere Aussagen über die Eliminierungs-Geschwindigkeit gewonnen werden könnten.

2. Unterschiede im Verhalten von Leukozytenpyrogen und endogenem Pyrogen

Nach vorliegenden Untersuchungen sollen keine physikochemischen Differenzen zwischen Leukozytenpyrogen und endogenem Pyrogen bestehen (HADLEY et al., 1966). Der sekundäre Fieberstoff im Kaninchenserum stammt aber nicht nur aus Blutgranulozyten, sondern auch aus anderen Organzellen (SHU und TAN, 1970). Deshalb wurde die Frage untersucht, ob biologische Unterschiede in der Fieberwirkung von Leukozytenpyrogen und dem endogenen Fieberstoff bestehen. Verglichen wurden NDV-induziertes LP und Thermo-LP (5 - 15 ml/kg) mit EP (1 ml/kg), das durch Influenza ARP_8 bzw. NDV stimuliert worden war. Zur Prüfung der Toleranz erhielten die Tiere 24 Stunden später die gleichen Pyrogendosen reinjiziert.

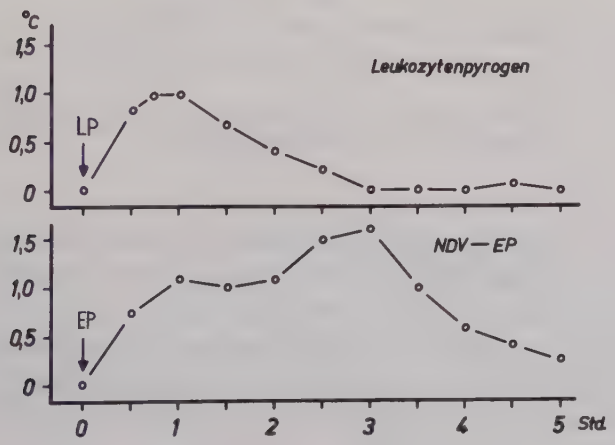

Abbildung 2: Fieberreaktionen der Kaninchen nach Injektion von Leukozytenpyrogen und endogenem Pyrogen. Abszisse: Stunden nach der Pyrogeninjektion. Ordinate: Temperaturanstieg in °C. Mittelwertkurven von je 4 Kaninchen. ↓ Zeitpunkt der Injektion.

Die Abbildung 2 zeigt, daß die Fieberkurven nach Gabe von LP und EP unterschiedlich verlaufen. Das LP verursacht nur einen Fiebergipfel, während das EP stets eine zweigipflige Fieberkurve induziert. Bemerkenswerterweise verhalten sich das virusinduzierte LP und das Thermo-LP einheitlich, ebenso wie andererseits die beiden virusinduzierten EP ebenfalls in ihren Fieberreaktionen übereinstimmen.

Pyrogen	Fieberkurve bei Erstinjektion	Fieberkurve bei Zweitinjektion
Thermo-Leukozytenpyrogen	monophasisch	monophasisch (= keine Toleranz)
NDV-Leukozytenpyrogen	monophasisch	monophasisch (= keine Toleranz)
NDV-endogenes Pyrogen	biphasisch	monophasisch (= Toleranz)
PR8-endogenes Pyrogen	biphasisch	monophasisch (= Toleranz)

Tabelle 1: Fiebertypen nach Injektion von Leukozytenpyrogen bzw. endogenem Pyrogen

Der Tabelle 1 ist zu entnehmen, daß auch das Toleranzverhalten bei Zweitinjektion von LP bzw. EP verschieden ist. Das Toleranzphänomen bleibt bei LP aus, bei EP dagegen ist es nachweisbar, gleichgültig, von welchem Virus es induziert wurde. Man erkennt die Toleranz daran, daß der erwartete zweite Fiebergipfel ausbleibt (s. auch Abbildung 7).

Diese Ergebnisse können so interpretiert werden, daß das LP biologisch einheitlich ist und nur aus einer Wirkstoff-Komponente besteht, während das virusinduzierte EP zwei

Komponenten enthält, die nicht zusammen, sondern in zeitlicher Aufeinanderfolge wirksam werden.

Nachfolgend werden Fieberreaktionen bei sechsmal wiederholten, im Abstand von 90 Minuten durchgeführten Reinjektionen von LP (10 ml/kg) bzw. EP (2 ml/kg) beschrieben. Der Abbildung 3 ist zu entnehmen, daß sich die Fieberantwort auf die Erstinjektion von LP bei weiteren Injektionen - möglicherweise als Summationseffekt - etwas verstärkt und dann über die nächsten 10 Stunden völlig gleichsinnig verhält. Demgegenüber beobachtet man eine andere Fieberkurve bei wiederholten Injektionen von virusinduziertem EP. Hier ist nach der zweiten Reinjektion ein Temperaturrückgang eingetreten, den man als partielle Toleranz deuten kann. Auch bei dieser Versuchsanordnung sind LP und EP im Hinblick auf das Toleranzphänomen biologisch different.

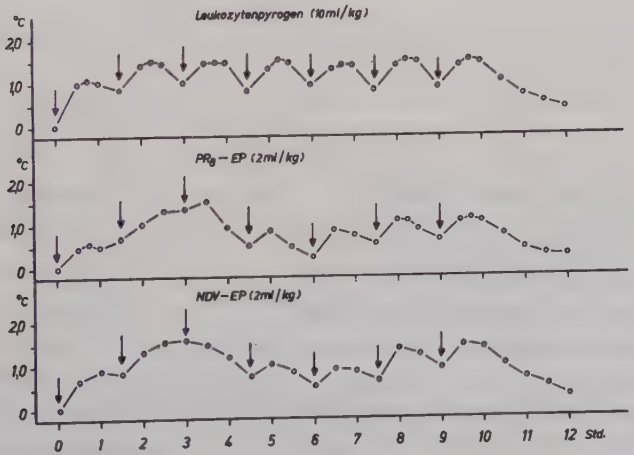

Abbildung 3: Fieberreaktionen der Kaninchen nach mehrmaligen Injektionen von LP, PR8-EP und NDV-EP. Abszisse: Stunden nach Pyrogeninjektion. Ordinate: Temperaturanstieg in °C. ↓ Zeitpunkt der Injektion. Mittelwertkurven von je 4 Kaninchen.

3. Dosiswirkungskurve des endogenen Pyrogens

Das NDV-induzierte EP aus Kaninchenserum wurde in Volumina von 0,0625 ml/kg bis 2,0 ml/kg - um den Faktor 2 ansteigend - Normaltieren injiziert, der jeweilige Fieberindex bis zur 3. Stunde bestimmt und der Mittelwert des pro Dosis verwendeten Kollektivs errechnet. Die Einzelwerte sind in Tabelle 2 eingetragen. Die Abbildung 4 zeigt die Dosiswirkungskurve des gewählten Bereichs.

ml EP/kg	FI-3						FI-3 Mittelwert
2	0,148	0,12	0,15	0,158	0,16	0,16	0,151
	0,165	0,13	0,16	0,164	0,15	0,16	
1	0,128	0,11	0,13	0,148	0,14	0,14	0,13
	0,14	0,14	0,14	0,115	0,14	0,11	
	0,1						
0,5	0,13	0,09	0,09	0,105	0,11	0,14	0,103
	0,095	0,12	0,11	0,118	0,09	0,1	
	0,128	0,1	0,1	0,075	0,1		
0,25	0,125	0,07	0,07				0,088
0,125	0,056	0,057	0,055				0,056
0,0625	0,055	0,02	0,02	0,045			0,035

Tabelle 2: Fieberindices der Dosiswirkungskurve

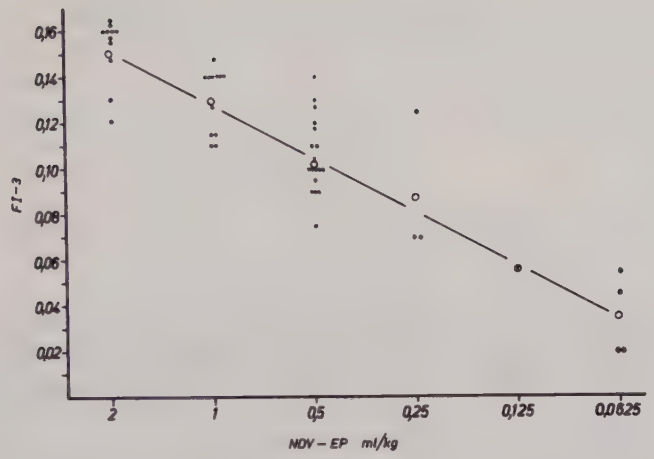

Abbildung 4: Dosiswirkungskurve von NDV-induziertem endogenem Pyrogen. Abszisse: EP-Menge/kg. Ordinate: 3-Stunden-Fieberindex. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Die Kreise markieren die Mittelwerte des jeweiligen Tierkollektivs.

4. Fiebertoleranz gegenüber Influenzavirus APR_8 nach Vorinjektion von Leukozytenpyrogen oder endogenem Pyrogen

Es ist bekannt, daß Kaninchen 24 Stunden nach Injektion von Para- oder Myxoviren gegenüber Influenzavirus APR_8 vollständig tolerant sind (SIEGERT, 1957; ATKINS and HUANG, 1958a; SIEGERT et al., 1962; SHU und TAN, 1970). Komplette Toleranz gegenüber APR_8 konnte auch mit 50 ml NDV-induziertem EP, das 24 Stunden zuvor injiziert wurde, erreicht werden (ATKINS and HUANG, 1958c). In den nachfolgend besprochenen Versuchen wurde der Abstand zwischen Vorinjektion von LP (10 ml/kg) oder EP (8 ml/kg) und nachfolgender Gabe

von Influenzavirus APR_8 (512 HE/kg) auf 3 Stunden verkürzt. Die Kontrolltiere erhielten nur Trispuffer (10 ml/kg) vorgespritzt.

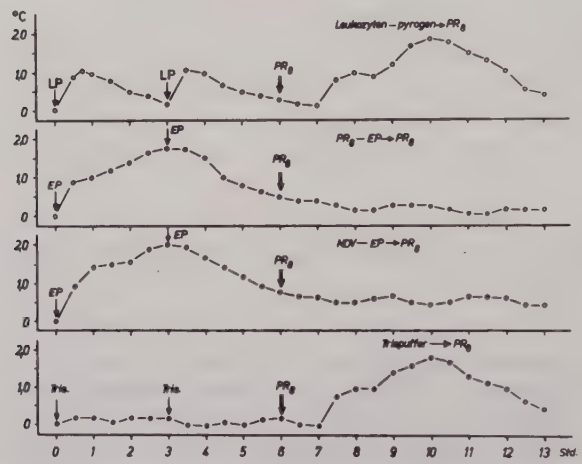

Abbildung 5: Fieberreaktion auf Influenzavirus APR_8 (512 HE/kg) nach Vorinjektion von LP, PR_8-EP oder NDV-EP. Abszisse: Stunden nach der Pyrogeninjektion. Ordinate: Temperaturanstieg in °C. ↓ Zeitpunkt der Injektion. Mittelwertkurven von je 4 Tieren.

Die in Abbildung 5 dargestellten Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von ATKINS und HUANG (1958c), daß durch eine EP-Injektion eine Toleranz gegenüber einer nachfolgenden Injektion von Influenzavirus APR_8 entsteht. Dieses Phänomen ist, wie die Temperaturkurven zeigen, nicht erst 24 Stunden später, sondern bereits sofort nach Absinken des EP-Fiebers nachweisbar, was unter den gegebenen Versuchsbedingungen nach 6 Stunden der Fall war. Wie nicht anders zu erwarten, verhielt sich das durch NDV oder APR_8 induzierte EP gleichsinnig. Hinsichtlich des LP wurden

die vorstehenden Ergebnisse (Tabelle 1; Abbildung 3) bestätigt, daß es keine Pyrogentoleranz zu erzeugen vermag. Hieraus wird der Schluß gezogen, daß der für die Toleranzentwicklung erforderliche Faktor humoraler Herkunft sein dürfte, weil er in LP fehlt.

5. Fiebertoleranz gegenüber Newcastle disease Virus nach Vorinjektion von Leukozytenpyrogen oder endogenem Pyrogen

Das Toleranzverhalten von NDV ist grundsätzlich von dem des APR_8 verschieden. Wird NDV 24 Stunden nach Myxovirus oder EP injiziert, so besteht keine Fiebertoleranz (SIEGERT, 1957; ATKINS and HUANG, 1958c; SIEGERT et al., 1962; SHU und TAN, 1970). Die vorstehend beschriebenen Versuche wurden in der gleichen Anordnung mit NDV (128 HE/kg) durchgeführt, um zu prüfen, ob 6 Stunden nach Vorinjektion von LP oder EP eine Toleranzentwicklung ausbleibt.

Die Abbildung 6 läßt erkennen, daß nach Vorbehandlung mit LP oder EP keine Pyrogentoleranz gegenüber NDV entstanden ist. Die Fieberkurve verläuft biphasisch und zeigt keine nennenswerte Abschwächung. Hierin liegt eine indirekte Bestätigung dafür, daß das Phänomen der kompletten Pyrogentoleranz nur bei Influenzavirus nachweisbar ist und sich LP und EP in ihrer biologischen Wirkung unterscheiden.

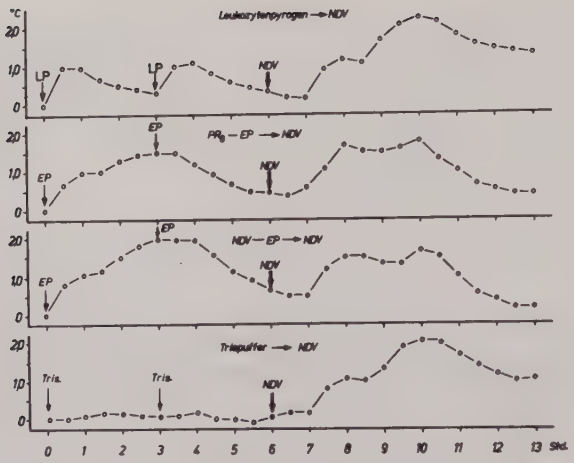

Abbildung 6: Fieberreaktionen auf NDV (128 HE/kg) nach Vorinjektion von LP, PR_8-EP oder NDV-EP. Abszisse: Stunden nach Pyrogeninjektion. Ordinate: Temperaturanstieg in °C. ↓ Zeitpunkt der Injektion. Mittelwertkurven von je 4 Tieren.

6. Fiebertoleranz bei Reinjektion von endogenem Pyrogen

Nachdem in den vorausgegangenen Abschnitten der Temperaturverlauf bei intravenöser Injektion von Myxo- bzw. Paramyxoviren nach Vorbehandlung mit LP oder EP untersucht worden ist, wird nachfolgend die Fieberreaktion bei Zweitinjektion von EP geprüft. Nach Literaturangaben soll sich bei täglich wiederholten EP-Injektionen allmählich eine Toleranz entwickeln, die sich in einem Verschwinden des zweiten Fiebergipfels äußert (ATKINS and HUANG, 1958c). Da die Injektionen bei diesen Autoren im Abstand von 24 Stunden erfolgten, ist im nachfolgenden Versuch der

Abstand auf 6 Stunden verkürzt worden. Die Kaninchen erhielten bei Erst- und Zweitinjektion je 2 ml EP, das durch NDV induziert wurde.

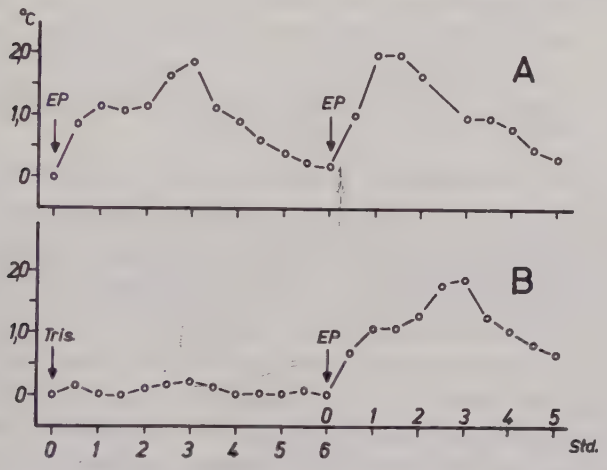

Abbildung 7: Fieberreaktionen auf Erst- und Zweitinjektion von NDV-EP im Abstand von 6 Stunden. Mittelwertkurven von je 5 Kaninchen. Kontrolle mit Trispuffer.

Aus Abbildung 7 geht hervor, daß bei Reinjektion von EP, 6 Stunden nach der ersten Gabe, die sonst biphasische Temperaturkurve einen anderen Verlauf nimmt. So ist der zweite Fiebergipfel nur noch schwach angedeutet zu erkennen; das Fiebermaximum verschiebt sich eindeutig zugunsten des ersten Gipfels. Die Berechnung der Fieberindices in Tabelle 3 weist allerdings darauf hin, daß die Temperaturantwort bei Erst- und Zweitinjektion insgesamt übereinstimmt, bestätigt aber, daß die Fiebermaxima eindeutig gegeneinander verschoben sind. Die Ursache für dieses Verhalten ist unbekannt.

	Fieberindex			Fiebergipfel (°C)	
	1,5 Std.	3 Std.	5 Std.	1.	2.
1. EP-Injektion	1,1	3,1	5,2	1,2	1,8
2. EP-Injektion	1,6	3,2	4,0	1,7	0,6

Tabelle 3: Vergleich der Fieberkurven bei Erst- und Zweitinjektion von endogenem Pyrogen

Um eine Interpretation des Phänomens zu versuchen, wurde EP (6 ml/kg) zweimal im Abstand von 6 Stunden injiziert. Jeweils 90 Minuten nach Erst- und Zweitinjektion - also während des ersten Fiebergipfels - wurden Blutproben durch Herzpunktion entnommen und in Mengen von je 20 ml/kg auf Normaltiere übertragen, um das zirkulierende EP zu messen. Da die Fieberhöhe und Dauer ein Maß für die EP-Konzentration sind, war zu erwarten, daß während des ersten Fiebergipfels nach Reinjektion entsprechend mehr EP vorhanden ist.

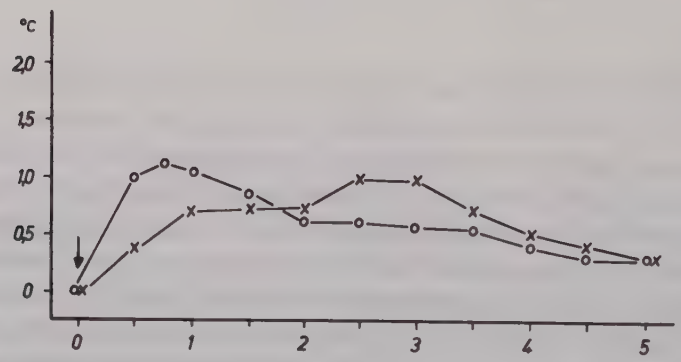

Abbildung 8: Fieberreaktionen nach passiver Übertragung von Seren, die nach ein- bzw. zweimaliger Injektion von NDV-EP gewonnen wurden. Mittelwertkurven von je 4 Kaninchen.
o——o Übertragung von Blut aus der ersten Fieberphase nach Erstinjektion.
x——x Übertragung von Blut aus der ersten Fieberphase nach Zweitinjektion

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Das nach Erstinjektion von EP entnommene Blut führte zu einer Temperaturkurve, die,an die Fieberreaktion nach LP erinnerna, das Maximum alsbald erreicht und allmählich wieder absinkt. Das nach Zweitinjektion entnommene Blut führte zu einem biphasischen Temperaturverlauf, wie nach EP-Injektion üblich. Eine Interpretation dieses Verhaltens ist nicht möglich.

Die nachfolgenden Untersuchungen befassen sich mit der EP-Toleranz, die bereits nach 6 Stunden nachweisbar war. Es wurde geprüft, wie sie sich entwickelt, wenn NDV-induziertes EP (2 ml/kg) in verschieden großen Zeitabständen reinjiziert wird (6 Stunden, 1, 2, 3, 4 und 5 Tage nach Erstinjektion).

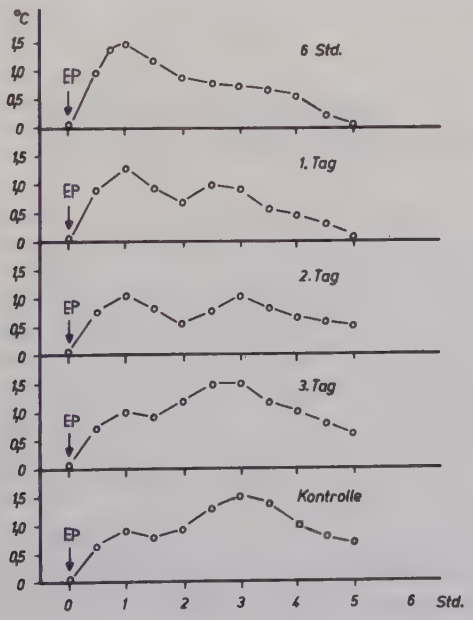

Abbildung 9: Abklingen der EP-induzierten EP-Toleranz bei täglicher Injektion. Mittelwertkurven von je 4 Kaninchen. ↓ Zeitpunkt der Injektion. Kontrolle mit Trispuffer.

Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Toleranz, die sich in einem Verschwinden des zweiten Fiebergipfels und einer geringen Steigerung des ersten Maximums äußert, am stärksten 6 Stunden nach Erstinjektion ausgeprägt ist. Schon 24 und 48 Stunden später stellt sich wieder der biphasische Temperaturverlauf ein, der vom 3. Tag an mit den unbehandelten Kontrollen übereinstimmt. Da das Ergebnis am 4. und 5. Tag mit dem 3. Tag übereinstimmt, ist auf eine Wiedergabe der Kurven verzichtet worden. Die Toleranzerscheinungen klingen demnach in wenigen Tagen wieder ab. Die Dauer und Stärke des Toleranzphänomens sind dosisabhängig (ATKINS and HUANG, 1958c). Auch hier drängt sich der Gedanke auf, daß zwei Wirkkomponenten für die beiden Temperaturmaxima verantwortlich sein könnten.

7. Fiebertoleranz gegenüber endogenem Pyrogen nach Injektion von Influenzavirus APR_8

Die Pyrogentoleranz bei Zweitinjektion von Myxoviren wurde damit erklärt, daß im Serum ein Hemmstoff (Toleranzfaktor) auftritt, der mit der pyrogenen Eigenschaft des Virion interferiert. Diese Hypothese basiert auf der passiven Übertragung des Toleranzphänomens mit dem Serum toleranter Kaninchen auf Normaltiere, wie man bei nachfolgender Virusinjektion erkennt. Ebenso läßt sich die Viruspyrogenität durch Vorbehandlung mit Toleranzserum in vitro beeinträchtigen (BENNETT et al., 1949b; SIEGERT, 1957; SIEGERT et al., 1967c). Die nachfolgenden Untersuchungen sollen darüber Auskunft geben, ob dieser humorale Hemmfaktor, der gegen das Viruspyrogen gerichtet ist, auch gegenüber EP wirksam ist.

Kaninchen erhielten im Abstand von 2 - 4 Stunden nach Influenzavirus APR_8 (128 HE/kg) je 2 ml/kg EP, das durch NDV induziert war.

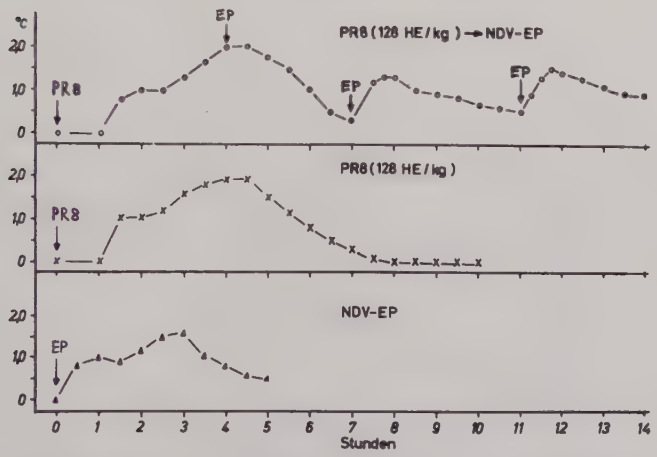

Abbildung 10: PR_8-induzierte EP-Toleranz.
Mittelwertkurven von je 4 Kaninchen.
Kontrollen nur mit PR_8 bzw. EP.
↓ Zeitpunkt der Injektion.

Abbildung 10 zeigt, daß auf dem Fiebermaximum des zweiten Gipfels injiziertes EP keine weitere Temperatursteigerung mehr induzieren kann, während es nach Fieberabfall 3 und 7 Stunden später eine eingipflige Kurve verursacht. Diese Tatsache weist darauf hin, daß eine partielle Toleranz vorlag. Die Frage nach dem Mechanismus dieses Vorgangs muß offen bleiben.

Weitere Untersuchungen galten der Rückbildung des Toleranzphänomens. Kaninchen, die einmal mit Influenzavirus APR_8 (1024 HE/kg) vorbehandelt waren, erhielten in größeren Abständen EP (2 ml/kg). Eine partielle Toleranz, bei

welcher der zweite Fiebergipfel fehlte, war nur 7 Stunden nach Virusinjektion deutlich ausgeprägt. Nacn 24 Stunden ist sie bereits wieder unwirksam. Hierin besteht kein Unterschied zur EP-Toleranz, wie Abbildung 11 zeigt.

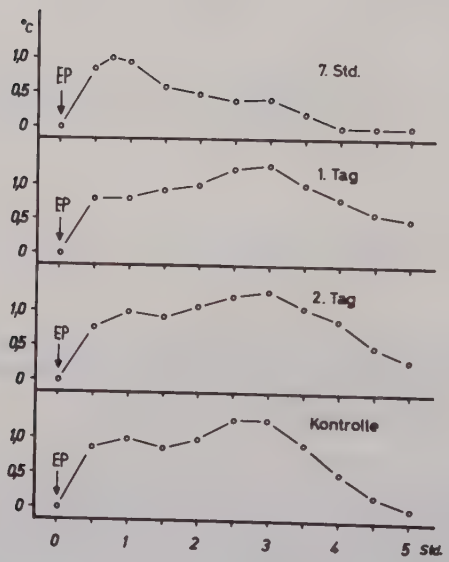

Abbildung 11: Abklingen der PR8-induzierten EP-Toleranz. Mittelwertkurven von je 3 Kaninchen. Kontrolle mit Trispuffer. ↓ Zeitpunkt der Injektion.

8. Fiebertoleranz gegenüber endogenem Pyrogen nach NDV-Injektion

In den nachfolgenden Versuchen wurde untersucht, ob auch nach NDV-Injektion (128 HE/kg) eine kurzfristige, partielle Toleranz gegenüber EP (2 ml) entsteht, das durch NDV induziert wurde. Die Ergebnisse, die in der Abbildung 12 dargestellt sind, gleichen weitgehend der Abbildung 10. Sie sprechen, soweit die primäre Fieberreaktion eine Aussage zuläßt, ebenfalls im Sinne einer vorübergehenden, kurzfristigen Toleranzerscheinung, da bei nachfolgender EP-Injektion nur der erste Fiebergipfel aufgetreten ist.

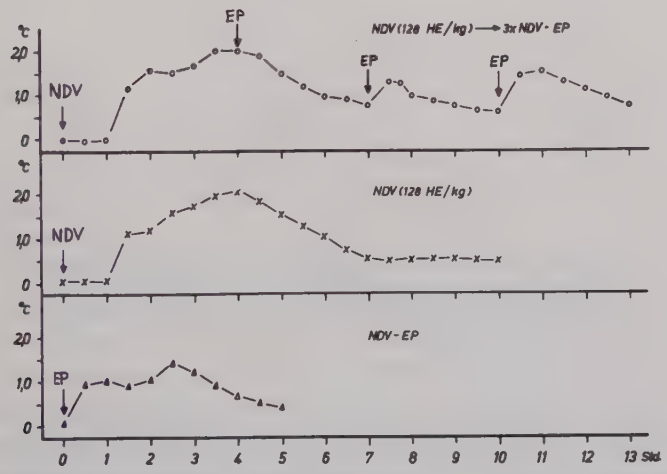

Abbildung 12: NDV-induzierte EP-Toleranz. Mittelwertkurven von je 4 Kaninchen.
Kontrollen nur mit NDV bzw. EP.
↓ Zeitpunkt der Injektion.

Das Wiederauftreten des 2. Gipfels, d.h. das Ende der Toleranz, konnte am 3. Tag beobachtet werden, wie die Abbildung 13 zeigt.

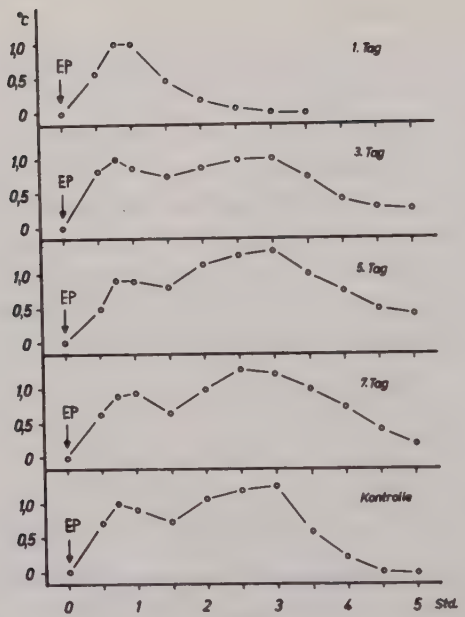

Abbildung 13: Abklingen der NDV-induzierten EP-Toleranz. Mittelwertkurven von je 3 Kaninchen. Kontrolle mit Trispuffer. ↓ Zeitpunkt der Injektion.

Das Toleranzphänomen nach NDV-Injektion ist demnach von etwas längerer Dauer als nach APR_8-Gabe, wobei jedoch berücksichtigt werden muß, daß die Pyrogentoleranz dosisabhängig ist. Auch in diesem Toleranzverhalten kann man einen Hinweis dafür sehen, daß die beiden Fiebergipfel auf verschiedenen Komponenten des EP beruhen.

9. Toleranzentwicklung bei mehrmaligen NDV-Gaben

Die Toleranz gegenüber EP nach vorheriger Virusinjektion (NDV bzw. APR_8) war bei Injektionen von EP gleich nach Fieberabfall und später nur partiell nachweisbar und verschwand wieder nach 24 - 72 Stunden. Zum Vergleich wurde das Toleranzverhalten gegenüber dem Viruspyrogen bei täglich im Abstand von 2 Stunden durchgeführten kleinen Dosen von NDV über 9 Tage geprüft. Parallel dazu erhielten Tiere die Gesamtmenge der kleinen NDV-Gaben täglich als einmalige Injektion. Ähnliche Versuche waren bereits von ATKINS und HUANG (1958c) vorgenommen worden. Sie hatten bei täglichen Injektionen von NDV als Ausdruck der zunehmenden partiellen Toleranz ein Absinken des zweiten Fiebergipfels und schließlich des ersten Gipfels beobachtet.

Abbildung 14 läßt erkennen, daß bei täglich wiederholten großen NDV-Gaben auch unter unseren Versuchsbedingungen eine entsprechende Toleranzentwicklung beobachtet wurde. Eine komplette Toleranz, die bei Influenzavirus APR_8 schon nach 24 Stunden nachweisbar ist, wurde bei NDV selbst bei neuntägiger Behandlung nicht beobachtet. Wird die große Virusdosis in kleine Einzeldosen unterteilt, die zweistündlich injiziert werden, so ergibt sich nur am 1. Tag ein typischer Fieberverlauf, der der einmaligen Gabe der hohen Virusdosis entspricht. Im Verlauf der nächsten Tage kommt es zu einer Verlängerung der Latenzphase, zu einer zunehmenden Verzögerung und schließlich nach einer Woche zu einer Reduktion der Fieberantwort. Vom 7. Tag an bestand totale Pyrogentoleranz.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Toleranzerscheinungen nach EP-Injektionen, so ist ein umgekehrtes Verhalten nicht zu übersehen. Während die EP-Toleranz nach wenigen Stunden ausgeprägt ist und rasch verschwindet, entwickelt sich die Pyrogentoleranz gegen NDV erst im Zeitraum einer Woche. Bei einmaligen hohen Dosen ist sie partiell, bei

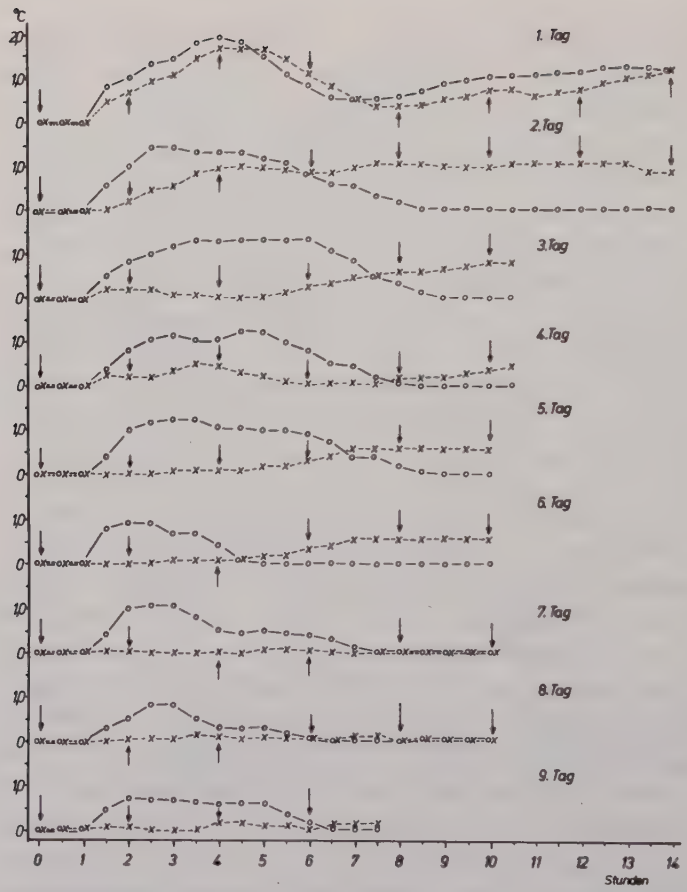

Abbildung 14: Toleranzentwicklung nach täglich einmaliger großer bzw. täglich mehrmaliger kleiner NDV-Gaben. Mittelwertkurven von je 2 Tieren.
o——o einmalige Injektion von 256 HE NDV/kg
x——x zweistündliche Injektionen von je 32 HE NDV/kg
↓ Zeitpunkt der Injektionen

häufigen Gaben kleinerer Dosen wird sie schließlich komplett. Möglicherweise handelt es sich um verschiedene Mechanismen.

IV. DISKUSSION

Die Pyrogenität der Myxoviren wurde erstmalig 1949 nach intravenöser Injektion von Influenzavirus bei Kaninchen erkannt (BENNETT et al., 1949a). Für die Entstehung des Virusfiebers ist die Freisetzung von endogenem Pyrogen verantwortlich (SIEGERT, 1955; ATKINS and HUANG, 1958a). Der gleiche Mechanismus war schon früher für die Entstehung des Endotoxinfiebers nachgewiesen worden (ATKINS and WOOD, 1955a/b; WOOD, 1955). Es fanden sich jedoch grundsätzliche Unterschiede zwischen Endotoxin- und Virusfiebertoleranz. Man weiß, daß die Endotoxintoleranz auf einer beschleunigten Eliminierung des Endotoxins aus der Blutbahn vorwiegend durch die erhohte Aktivität des RES, beruht (BEESON, 1947b; FARR et al., 1954; ATKINS and WOOD, 1955a). Bei der Viruspyrogentoleranz verschwindet dagegen das exogene Viruspyrogen nicht schneller aus dem strömenden Blut als bei unvorbehandelten Kaninchen (ATKINS and HUANG, 1958c). Für die Auslösung des Toleranzphänomens wird ein humoraler "Toleranzfaktor" verantwortlich gemacht, der das exogene Pyrogen blockiert (SIEGERT, 1957; SIEGERT et al., 1967b).

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die Feststellung, daß intravenös verabreichtes NDV bei normalen und toleranten Tieren synchron aus der Blutbahn entfernt wird und nach 3 Stunden nicht mehr nachweisbar ist. Diese Erkenntnis ist für die Toleranzversuche mit endogenem Pyrogen wichtig, weil ein Fieberinduktor in Form von Virus zur Zeit der Gewinnung von endogenem Pyrogen, 4 Stunden nach Injektion, ausgeschlossen werden kann.

Bei Toleranzversuchen mit endogenem Pyrogen durch Reinjektion nach 24 Stunden wurde die Meinung geäußert, daß der erste Fiebergipfel jeweils durch die direkte Wirkung des

endogenen Pyrogens zustande kommt, während der zweite Gipfel durch Selbstinduktion erzeugt werde (ATKINS and HUANG, 1958c). Da man inzwischen weiß, daß endogenes Pyrogen nicht nur aus Blutgranulozyten, sondern auch von anderen Organzellen freigesetzt wird (SHU und TAN, 1970), ist die bisherige Erklärung von ATKINS und HUANG nicht aufrechtzuerhalten.

Physikochemische Unterschiede zwischen Leukozytenpyrogen und endogenem Pyrogen sollen nicht bestehen (HADLEY et al., 1966), jedoch haben sich einige biologische Differenzen ergeben. Sie betreffen die Fieberantwort und die Toleranzerscheinungen: 1. Auf intravenöse Verabreichung von LP hin entwickelt sich, unabhängig von der Dosis, stets nur eine eingipflige Temperaturkurve, während das EP eine zweigipflige Kurve induziert. 2. Eine Toleranzentwicklung wurde nach Reinjektion nur bei endogenem Pyrogen beobachtet, die sich in einer eingipfligen Kurve äußert; bei LP zeigte sich keine Änderung der Fieberantwort. Diese Erscheinungen sind unabhängig davon, ob es sich um APR_8- oder NDV-induziertes EP, bzw. um Thermo- oder NDV-induziertes LP handelt. Deswegen wird vermutet, daß die beiden Gipfel des EP-Fiebers durch zwei Komponenten im virusinduzierten EP ausgelöst werden, die in zeitlicher Aufeinanderfolge wirksam werden. Das LP wäre demgegenüber als biologisch einheitlich mit nur einer Wirkstoffkomponente anzusehen. Diese Vorstellung wurde durch Untersuchungen ergänzt, die auch unterschiedliche Fieberantworten bei Reinjektionen von EP und LP in kurz aufeinanderfolgenden Abständen zeigten. Bei den LP-Kurven handelt es sich möglicherweise um eine Summation der Fieberwirkungen, während das EP eine Toleranzentwicklung erkennen läßt.

Bei Reinjektionen von EP während gleicher Fieberphasen wurden Phänomene beobachtet, die noch nicht zu deuten sind. Daß der zweite Gipfel nach wiederholter EP-Gabe verschwindet, war bekannt (ATKINS and HUANG, 1958c), nicht jedoch die Verschiebung des Fiebermaximums vom

zweiten auf den ersten Gipfel, wobei die Temperaturantwort, gemessen an den Fieberindices, gleich bleibt. Die passive Übertragung von EP, das jeweils während des ersten Fiebergipfels gewonnen wurde, induziert dosisabhängige Temperaturerhöhungen. Hierbei gleicht die erste Kurve einer LP- und die zweite Kurve einer normalen EP-Fieberantwort. Die Toleranzwirkung klingt bereits drei Tage nach Erstinjektion von EP vollständig ab. Es ist jedoch zu bedenken, daß die Dauer und Stärke dieses Phänomens dosisabhängig sind (FRENCH, 1952; WAGNER, 1953; ATKINS and HUANG, 1958c). Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse liegt ebenfalls die Annahme von zwei unterschiedlichen Wirkungskomponenten nahe.

Die schon 1957 geäußerte Vermutung eines humoralen Hemmfaktors (SIEGERT, 1957; SIEGERT et al., 1967b) wird gestützt durch die Tatsache, daß LP, welches als biologisch einheitliche Substanz angesehen wird, im Gegensatz zu APR_8- und NDV-induziertem EP keine Toleranz gegenüber nachfolgendem homologem und heterologem Myxovirus bewirkt. Der gegen das exogene Viruspyrogen gerichtete Toleranzfaktor ist auch gegenüber EP wirksam, indem er eine partielle Toleranz erzeugt, die am Ausbleiben des zweiten Temperaturgipfels erkennbar ist. Dieses Verhalten trifft sowohl für NDV als auch für APR_8 als erstinjiziertes Pyrogen zu. Das Toleranzphänomen klingt nach Vorinjektion von Viruspyrogen, ähnlich wie nach EP, ab. Die APR_8-induzierte Toleranz verschwindet am schnellsten, wobei jedoch ebenfalls die Dosisabhängigkeit des Phänomens eine Rolle spielt. Die zeitlich voneinander abhängige, verschieden starke Ausprägung der beiden Fiebergipfel der EP-Kurven spricht wiederum für zwei möglicherweise unterschiedliche Wirkungskomponenten.

Im Vergleich zu der schnell auftretenden Toleranzerscheinung bei EP, entwickelt sie sich ganz allmählich, wenn NDV mehrstündlich oder täglich wiederholt verabreicht

wird. Eine komplette Toleranz wird nur bei häufig aufeinanderfolgenden Dosen erreicht, sonst bleibt die Fiebertoleranz partiell. Auch nur bei kurzfristig und oft wiederholten NDV-Injektionen kommt es zu einer Verlängerung der Latenzphase mit Verzögerung der Fieberantwort. Es mag sich auch hier um verschiedene Wirkungsmechanismen handeln.

Der bereits früher postulierte humorale "Toleranzfaktor" dürfte den Schlüssel zum Mechanismus der Viruspyrogentoleranz darstellen und als Hemmstoff gleichermaßen auch für das Toleranzphänomen bei EP verantwortlich sein. Außerdem ist zu vermuten, daß die beiden Fiebergipfel sowohl nach Gabe von exogenem Viruspyrogen als auch nach Verabreichung von EP durch zwei unterschiedliche Wirkstoffkomponenten hervorgerufen werden, die zu verschiedenen Zeitpunkten eine Fieberantwort auslösen und auch im Toleranzmechanismus eine Rolle spielen können. Viele Fragen über die Ursachen der verschiedenen Toleranzphänomene bleiben noch offen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Der Toleranzmechanismus der Viruspyrogene beruht nicht wie bei bakteriellem Endotoxin auf einer beschleunigten Elimination des exogenen Fieberstoffs durch das RES aus der Blutbahn. Das Virus verschwindet bei normalen und toleranten Tieren synchron aus dem Blut. Die Pyrogentoleranz bei Zweitinjektion von Myxo- bzw. Paramyxoviren wird auf einen humoralen Hemmfaktor zurückgeführt. Durch passive Übertragung von endogenem Pyrogen kann bei normalen Tieren eine partielle oder totale Fiebertoleranz gegen exogenes Viruspyrogen erzeugt werden. Dieser "Toleranzfaktor" scheint auch für das Toleranzphänomen bei endogenem Pyrogen verantwortlich zu sein, da bei Reinjektion nur eine eingipflige Temperaturantwort im Gegensatz zu der normalerweise zweigipfligen Kurve auftritt. Leukozytenpyrogen verursacht dagegen weder gegenüber Viruspyrogen noch gegenüber endogenem Pyrogen oder gegen sich selbst eine Änderung der Fieberreaktion. Myxovirus und endogenes Pyrogen weisen Kreuztoleranz auf.

Das Leukozytenpyrogen scheint eine biologisch einheitliche Substanz darzustellen, während das virusinduzierte, endogene Pyrogen zwei Wirkstoffkomponenten enthalten könnte, die nicht gemeinsam, sondern in zeitlicher Aufeinanderfolge wirksam werden.

Bei schnell aufeinanderfolgenden Injektionen von endogenem Pyrogen verschieben sich die Fiebermaxima, ohne daß eine Erklärung dieses Verhaltens möglich ist. Unterschiedliche Toleranzmechanismen können auch bei der Entwicklung der Fieberkurven bei mehrstündlich aufeinanderfolgenden NDV-Injektionen und bei täglich wiederholten NDV-Injektionen eine Rolle spielen. Komplette Toleranz und verlängerte Latenzzeit werden nur bei der zuerst genannten Form der Verabreichung erzielt.

Die Mechanismen der unterschiedlichen Toleranzphänomene bei Viruspyrogen, endogenem Pyrogen und Leukozytenpyrogen sind noch nicht deutbar.

LITERATURVERZEICHNIS

Allen, I.V.: The cerebral effects of endogenous serum and granulocytic pyrogen. Brit.J.Exp.Path. 46 (1965), 25.

Atkins, E.: The relation of circulating endogenous pyrogen to the cause of experimental fever. Bull.New York Acad.Med. 32 (1956), 846.

Atkins, E.: Pathogenesis of fever. Physiol.Rev. 40 (1960), 580.

Atkins, E., and Freeman, L.R.: Studies in staphylococcal fever. I.Response to bacterial cells. Yale J.Biol. and Med. 35 (1963), 451.

Atkins, E., M. Cronin, and P. Isacson: Endogenous pyrogen released from rabbit blood cells incubated in vitro with parainfluenzal virus. Science 146 (1964), 1469.

Atkins, E., and W.C. Huang: Studies on the pathogenesis of fever with influenzal viruses. I. The appearance of an endogenous pyrogen in the blood following intravenous injection of virus. J.Exp.Med. 107 (1958a), 383.

Atkins, E., and W.C. Huang: Studies on the pathogenesis of fever with influenzal viruses. II. The effects of endogenous pyrogen in normal and virus-tolerant recipients. J.Exp.Med. 107 (1958b), 403.

Atkins, E., and W.C. Huang: Studies on the pathogenesis of fever with influenzal viruses. III. The relation of tolerance to the production of endogenous pyrogen. J.Exp.Med. 107 (1958c), 415.

Atkins, E., and W.B. Wood: Studies on the pathogenesis of fever. I. The presence of transferable pyrogen in the bloodstream following the injection of typhoid vaccine. J.Exp.Med. 101 (1955a), 519.

Atkins, E., and W.B. Wood: Studies on the pathogenesis of fever. II. Identification of an endogenous pyrogen in the bloodstream following the injection of typhoid vaccine. J.Exp.Med. 102 (1955b), 499.

Beeson, P.B.: Tolerance to bacterial pyrogens. II. Role of the reticuloendothelial system. J.Exp.Med. 86 (1947),39.

Bennett, I.L.: Studies on the pathogenesis of fever. V. The fever accompanying pneumococcal infection in the rabbit. Bull. Johns Hopkins Hosp. 98 (1956), 216.

Bennett, I.L., and P.B. Beeson: Studies on the pathogenesis of fever. II. Characterization of fever-producing substances from polymorphonuclear leukocytes and from the fluid of sterile exudates. J.Exp.Med. 98 (1953), 493.

Bennett, I.L., R.R. Wagner, and V.S. LeQuire: Pyrogenicity of influenza virus in rabbits. Proc.Soc.Exptl.Biol. Med. 71 (1949a), 132.

Bennett, I.L., R.R. Wagner, and V.S. LeQuire: The production of fever by influenzal viruses. II. Tolerance in rabbits to the pyrogenic effect of influenzal viruses. J.Exptl.Med. 90 (1949b), 335.

Cooper, I.E., W.I. Cranston, and A.J. Honour: The site of action of leucocyte pyrogen in the rabbit brain. J.Physiol. 186 (1966), 22.

Farr, R.S., S.L. Clark, J.E. Proffitt, and D.H. Campbell: Some humoral aspects of the development of tolerance to bacterial pyrogens in rabbits. Am.J.Physiol. 177 (1954), 269.

French, E.L.; The pyrogenic effects of the influenzal-mumps group of viruses in the laboratory rabbit. Australian J.Exptl.Biol.Med.Sci. 30 (1952), 479.

Fritz, I.E., G.W. Gander, and F. Goodale: Electron microscopic observations of rabbit leucocytic pyrogen. Exp.Molec.Path. 3 (1964), 19.

Gander, G.W., and F. Goodale: Chemical properties of leucocytic pyrogen. I. Partial purification of rabbit leucocytic pyrogen. Exp.Molec.Path. 1 (1962), 417.

Greisman, S.E., and W.E. Woodward: Mechanisms of endotoxin tolerance. III. The refractory state during continous intravenous infusions of endotoxin. J.Exp.Med. 121 (1965), 911.

Greisman, S.E., E.J. Young, and W.E. Woodward: Mechanisms of endotoxin tolerance. IV. Specificity of the pyrogenic refractory state during continous intravenous infusions of endotoxin. J.Exp.Med. 124 (1966), 983.

Hadley, W.K., J.O'Rourke, and E. Atkins: Purification and characterization of an endogenous pyrogen. Yale J. Biol.Med. 38 (1966), 339.

Hahn, H.H., D.C. Char, W.B. Postel, and W.B. Wood: Studies on the pathogenesis of fever. XV. Production of endogenous pyrogen by peritoneal macrophages. J.Exp. Med. 126 (1967), 357.

Hall, C.H., and E. Atkins: Studies on tuberculin fever. I. The mechanism of fever in tuberculin hypersensitivity. J.Exp.Med. 109 (1959), 339.

Harris, S., and W. Henle: Lymphocytopenia in rabbits following intravenous injection of influenzal virus. J.Immunol. 59 (1948), 9.

Ho, M.: Unpublished results (1960). Zitiert nach: Ho, M., K.H. Fantes, D.C. Burke, and N.B. Finter: Interferons or Interferon-like inhibitors induced by non-viral substances. In: Interferons. N.B. Finter ed. Amsterdam (1966) (North Holland Research Monographs. Frontiers of Biology. 2.),187.

Kanoh, S., M. Kawasaki: Studies on Myxovirus pyrogen. I. Interaction of Myxovirus and rabbit polymorphonuclear leucocytes. Biken J. 9 (1966), 177.

Kanoh, S., M. Yoshida, and H. Kawasaki: Studies on the pyrogen. IV. Some factors influence on the production of leucocytic pyrogen from polymorphonuclear leucocyts in vitro. Japan J.Pharm. (1966).

King, M.K., and W.B. Wood: Studies on the pathogenesis of fever. V. The relation of circulating endogenous pyrogen to the fever of acute bacterial infections. J.Exp.Med. 107 (1958), 305.

Kohlhage, H., and T. Rieck: Increase in activity of virus induced serum pyrogen after chromatography on Biogel columns. Life Science 6 (1967), 2665.

Kohlhage, H., W. Pollmann, and R. Siegert: Studies on the differentiation of Myxovirus induced interferon and endogenous pyrogen from rabbits. Life Science 7 (1968), 627.

Kosel, B., and H. Kohlhage: Effects of actinomycin on in vivo and in vitro formation of endogenous rabbit pyrogen induced with Myxoviruses or stimulated with endotoxin. Arch.Virusforsch. 32 (1970), 209.

Petersdorf, R.G., W.R. Keene, and I.L. Bennett: Studies on the pathogenesis of fever. IX. Characteristics of endogenous serum pyrogen and mechanisms governing its release. J.Exp.Med. 106 (1957), 787.

Rafter, G.W., F. Cheuk, D. Krause, and W.B. Wood: Studies on the pathogenesis of fever. XVI. Further observations on the chemistry of leucocytic pyrogen. J.Exp. Med. 123 (1966), 433.

Rieck, T., und H. Kohlhage: Behaviour of different endogenous pyrogen on a biogel column. Life Sciences 9 (1970), 985.

Sever, J.L.: Application of a microtechnique to viral serological investigations. J.Immunol. 88 (1962), 320.

Siegert, R.: Natur und Wirkungsmechanismus der Viruspyrogene (Vortrag Med.Ges. Mbg./Lahn), Klin.Wschr. 35 (1957), 652.

Siegert, R.: Natur und Wirkungsmechanismus der Viruspyrogene. Dtsch.Med.Wschr. 92 (1967a), 2183.

Siegert, R.: Toxizität animaler Viren. Zbl.Bakt.I.Orig. 205 (1967b), 110.

Siegert, R.: Die Fieberstoffe der Viren. Umschau der Wissenschaft und Technik Nr.9 (1968), 279.

Siegert, R.: Fieber- und Interferonsystem. Vortrag im Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt/Main am 19.10.1971. Ref.: Arzneimittelforsch. 1971 (im Druck).

Siegert, R., E. Betz, G. Schmidt: Zur Problematik des Pyrogenbegriffs dargestellt am Beispiel der Viruspyrogene. S.-B.Ges.Beförd.ges.Naturwissensch. Marburg 83/84 (1962), 255.

Siegert, R., P. Braune: Studien zur biologischen Charakterisierung der Viruspyrogene. Vortrag 25.Tgg.Dtsch. Ges.Hyg.Mikrobiol., Bad Kissingen 1955.

Siegert, R., P. Braune: The pyrogens of Myxoviruses. I. Induction of hyperthermia and its tolerance. Virology 24 (1964a), 209.

Siegert, R., P. Braune: The pyrogens of Myxoviruses. II. Resistance of Influenza A pyrogens to heat, ultraviolet, and chemical treatment. Virology 24 (1964b), 218.

Siegert, R., W. Pollmann und H.L. Shu: Zur chemischen Natur des endogenen, durch Myxoviren induzierten Pyrogens, Zschr. Naturforschung 22 (1967a), 320.

Siegert, R., H.L. Shu und H. Kohlhage: Correlation between fever and interferon titer in rabbits after induction with Myxoviruses. Life Sciences 6 (1967b), 615.

Siegert, R., H.L. Shu, W. Pollmann und H. Menzel: Versuche zur Abtrennung des pyrogenen Prinzips von Myxoviren. Zschr. Naturforschung 22b (1967c), 155.

Shu, H.L., und T.P. Tan: Induktion von endogenem Pyrogen und Interferon durch Newcastle disease Virus. Arch. Virusforsch. 29 (1970), 287.

Shulman, J.A., and R.G. Petersdorf: Relationship of endogenous pyrogen to lysozym. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 114 (1963), 376.

Taborsky und H. Kohlhage: Persönliche Mitteilung, 1970.

Taborsky und H. Kohlhage: Acta virol. (im Druck).

Wagner, R.R.: Production of fever by influenzal viruses. IV. Tolerance to mumps and influenza pyrogens. Proc. Soc.Exp.Biol.Med. 83 (1953), 612.

Wagner, R.R., I.L. Bennett, and V.S. LeQuire: Production of fever by influenzal viruses. I. Factors influencing the febrile response to single injections of virus. J.Exp.Med. 90 (1949), 321.

Wood, W.B.: The pathogenesis of fever. Am.J.Med. 18 (1955), 351.

Wood, W.B.: Die Pathogenese des Fiebers. Med.Prisma (Boehringer Ingelheim) 3 (1966).

Herrn Professor Dr. med. R. Siegert danke ich für die Überlassung des Themas und die wertvolle Hilfe bei der endgültigen Abfassung der Arbeit.

Herrn Dr. med. H.-L. Shu gilt mein Dank in bezug auf die Einführung in die Problematik des Stoffes und die praktische Durchführung der Versuche.

L e b e n s l a u f

Am 28. Juni 1942 wurde ich als Tochter und viertes Kind von Otto Döhner, Dipl.-Ing. Oberbaurat im technischen Schuldienst (jetzt i.R.) und seiner Ehefrau Erna geb. Weber in Frankfurt/Main geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Oberursel/Ts. und in Frankfurt/M. 1953 wechselte ich zur Herder-Schule, Realgymnasium für Mädchen, über. Das Abitur legte ich am 26.2.1962 an der Klinger-Schule ab. Dort besuchte ich seit der Mittleren Reife den Zweig Wirtschaftsgymnasium.

Das Medizinstudium begann ich im Sommer-Semester 1962 in Frankfurt/M., und ich schloß es am 1.8.1968 mit dem Staatsexamen in Marburg/L. ab. Auch alle Zwischenexamina legte ich in Marburg ab. Je ein klinisches Semester studierte ich auch in Kiel und Frankfurt.

Meine akademischen Lehrer in Marburg/L. waren die Professoren: Berendes, Buchholz, Büscher, Braun-Falco, Dittrich, Exner, Gedigk, Hensel, Heuser, Jacob, Linneweh, Löhr, Mann, Martini, Petry, Rohen, Schleyer, Schmid, Schwaiger, Siegert, Straub, Streicher und Wendt.

Vom 1.9.1968 bis 31.12.1969 war ich als Medizinalassistentin in der chirurgischen und inneren Abteilung des Stadt- und Kreiskrankenhauses Einbeck (Niedersachsen) tätig. Zum 1.1.1970 erhielt ich meine Approbation als Ärztin. Danach arbeitete ich 9 Monate in der geburtshilflichen und gynäkologischen Abteilung des St.Marienkrankenhauses in Hofheim/Ts. Hier fiel der Entschluß zur Aufnahme der Facharztausbildung für Innere Medizin, die ich mit einer einjährigen Tätigkeit am Kreiskrankenhaus Siegen, Haus Hüttental, begann. Am 1.10.1971 bin ich in die Innere Abteilung des Krankenhauses in Einbeck zurückgekehrt, wo ich zur Zeit Assistenzärztin bei Herrn Professor Dr. med. Heckner, apl. Professor für Hämatologie an der Universität Göttingen, bin.